Original Article

In Vitro Development of Cattle Embryo as Affected by Glucose, Serum and EDTA

Pirestani A., Ph.D., Hossieni SM., D.V.M., Moulavi F., B.Sc., Hajian M., M.Sc., Abedi P., B.Sc., Fourozanfar M., Ph.D., Ostadhossieni S., D.V.M., Hossieni L., M.Sc., Ghasemzadehnava H., Ph.D., Tajik P., Ph.D., Nasr Esfahani M.H., Ph.D. *

** P.O.Box: 19395-4644, Embryology Department, Royan Institute, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The aim of this study was to evaluate the effect of different modifications of sequential synthetic oviductal_fluid (SOF) culture system on developmental competence of in vitro matured/fertilized cattle embryos.

Materials and Methods: Bovine oocytes were matured and fertilized in vitro and then presumptive zygotes were randomly cultured for up to 9 days in different modifications of SOF culture system to consider the effects of glucose, serum and EDTA on embryo development.

Results: All the embryo culture systems were efficient to support bovine embryo development till blastocyst stage. There was no significant difference in the ratios of embryos; however, the ratios of blastocyst and also hatchability of embryos cultured in SOF C (51.3%, 43.0% and 83.8%, respectively) were significantly higher than those of all the other SOF groups. Furthermore, while glucose had a partial improving effect on embryo development, a significant decrease in embryo development beyond the morula stage was observed in embryos cultured in SOF system with initial supplementation of EDTA compared with all the other groups.

Conclusion: It was concluded that appropriate modifications of SOF culture systems can result in significantly great in vitro embryo development.

Keywords: In vitro embryo development, Bovine zygotes, SOF, Serum

Archive of SID

www.SID.ir

مقاله تحقیقی

تاثیر گلوکز، سرم و EDTA بر تکوین آزمایشگاهی جنین گاو

اکبر پیرستانی Ph.D*، سید مرتضی حسینی D.V.M.، فریبا مولوی B.Sc.**، مهدی حاجیان M.Sc.**، پروانه عابدی B.Sc.****

محسن فروزانفر Ph.D.*، سمیه استاد حسینی D.V.M.**، لاله حسینی M.Sc.**، حمید قاسم زاده نوا Ph.D.*****

پرویز تاجیک Ph.D.*** ، ✍ محمد حسین نصر اصفهانی Ph.D.****

*گروه مامایی و بیماریهای تولید مثل دام، دانشکده تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

**گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی پایگاه تحقیقاتی علوم سلولی اصفهان، ایران

***گروه علوم‌پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، ایران

****گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران

تاریخ وصول: اسفند ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۸

چکیده

هدف: ارزیابی اثر اصلاحات مختلف محیط کشت SOF (synthetic oviductal fluid) بر توان تکوین آزمایشگاهی جنین‌های گاو

مواد و روش‌ها: اووسیت‌های گاو پس از انجام بلوغ و لقاح آزمایشگاهی به‌طور تصادفی برای مدت ۹ روز در محیط‌های حاصل از اصلاحات محیط SOF برای بررسی آثار گلوکز، سرم و EDTA کشت داده شدند.

یافته‌ها: درصد کلیواژگروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت. با این وجود، میزان تکوین بلاستوسیست و شکوفایی روز ۷ و ۸ گروه SOF C (به‌ترتیب ۵۱/۳، ٤۳/۰ و ۸۳/۸) به‌طور معنی‌داری بالاتر از دیگر گروه‌ها بود. از طرفی گلوکز دارای اثر بهبود نسبی و همچنین EDTA طی مرحله اولیه کشت باعث کاهش چشمگیر تکوین جنین‌ها شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان داد که اصلاحات مناسب در سیستم کشت متوالی SOF منجر به افزایش چشمگیر تکوین جنین خواهد شد.

کلید واژه‌ها: تکوین آزمایشگاهی گاو، زیگوت‌های گاو، SOF، سرم

مقدمه

اولین گوساله حاصل از لقاح آزمایشگاهی در سال ۱۹۸۱ توسط براکت (Brackett) و همکاران متولد شد [۱]. از بهبود روندهای بلوغ آزمایشگاهی و لقاح آزمایشگاهی (IVM/IVF: In Vitro Maturation/In Vitro Fertilization) اووسیت‌ها و نیز کشت آزمایشگاهی زیگوت‌های حاصل (IVC: In Vitro Culture) انجام شده است. با این وجود میزان نهایی تولید جنین‌های آزمایشگاهی قابل انتقال حدود ۳۰ تا ٤۰ درصد است که هنوز بسیار پایین‌تر از میانگین ارقام

✍ آدرس مکاتبه: ایران، اصفهان، پایگاه تحقیقاتی علوم سلولی اصفهان، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، گروه جنین‌شناسی، صندوق پستی ۴۶۴۴- ۱۹۳۹۵ E-mail:mh_nasr@med.mui.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

موجود در زمینه استحصال جنین با روش تلقیح مصنوعی دام‌های سوپراوووله شده و فلاشینگ رحمی است. به‌نظر اغلب محققین مهمترین علت اختلاف چشمگیر کیفیت جنین‌های آزمایشگاهی (*in vitro*) و طبیعی (*in vivo*) ناشی از عدم کفایت شرایط و محیط‌های بلوغ و کشت آزمایشگاهی در مقایسه با شرایط طبیعی کشت جنین است.

از سال ۱۹۶۰ محیط کشت تجاری TCM199 به‌عنوان مهمترین و معمولترین محیط کشت جنین پستانداران بود که اگرچه در حال حاضر هم بعضی از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی متمایل به استفاده از این محیط کشت با افزودن سرم، BSA (Bovine Serum Albumin) و سایر فاکتورهای رشد هستند، ولی میزان تکوین بلاستوسیست‌های پستانداران در این محیط به ندرت بیش از ۳۰ تا ٤٠ درصد خواهد بود [۲]، بنابراین استفاده از سیستم‌های هم‌کشتی با استفاده از سلول‌های حمایتی سوماتیک (از قبیل سلول‌های اویداکتی، گرانولوزا، BRL) یک جزء افزودنی ناگزیر برای به‌دست آوردن در صد قابل قبول بلاستوسیست در نظر گرفته می‌شود [۷-۲] .

با وجود مزایای فراوان حضور سلول‌های هم‌کشتی در محیط کشت، افزودن سلول‌ها به محیط کشت یک امر پرهزینه است که احتمال ایجاد آلودگی و عفونت جنین با عوامل ویروسی را نیز به همراه دارد [۷-۵]. بنابراین طی دو دهه اخیر تمایل کلی برای حذف سلول‌های سوماتیک از سیستم هم‌کشتی و تولید فرمول‌های کاملاً باز معین برای تهیه و ساخت توسط خود پرسنل آزمایشگاه به‌وجود آمد [۳، ٤ و۸]. در این راستا محققین انواع مختلف فرمول‌های کشت جنین را ارایه کرده اند که از جمله آن‌ها SOF (Synthetic Oviductal Fluid)، KSOM (K Simplified Oviductal Medium)، (Charles Ronsenkrans) CR1aa و نیز محیط‌های تجاری شده با عنوان G1/G2، CR2aa است [۱۱-۹].

اگرچه هر کدام از این فرمول ها به‌نظر محققین ارایه دهنده فرمول آن‌ها، کامل‌ترین ترکیب موجود است ولی محیط SOF در واقع مهم‌ترین و معمول‌ترین ترکیب است که تکرار پذیری نتایج آن در مقالات و گزارش‌های مختلف، بیشترین اتفاق نظر را دارد [۹ و ۱۱]).

نکته قابل توجه آن است که با وجود این‌که محیط SOF بر مبنای آنالیز مایع درون لوله اویداکت که محل طبیعی تکوین زیگوت تا مرحله بلاستوسیست است طراحی و ارایه شده است [۱۱]، تفاوت‌های زیادی بین فرمول‌های SOF موجود است، به نحوی که گزارش‌های مختلفی در مورد اثر افزودن بعضی مواد از جمله EDTA، سرم، BSA، گلوکز و نیز فاکتورهای رشد در مراحل مختلف آن وجود دارد که بررسی دقیق بین اثر عوامل مختلف را غیرممکن نموده است [۱۱].

یکی از معمول‌ترین افزودنی‌های محیط کشت سرم جنین گاو FCS است که مقالات متعددی در زمینه آثار آن وجود دارد. از سوی دیگر گلوکز به عنوان جزء مهم انرژی قابل متابولیسم جنین های آزمایشگاهی معرفی شده است ولی میزان تداخل اثر انرژی‌زایی سرم وگلوکز به درستی بررسی نشده است. EDTA نیز یک جزء دیگر محیط SOF و نیز سایر محیط های کشت است که بحث در مورد آثار سودمند یا مضر آن هنوز ادامه دارد [۱، ۲، ۸ و۱۱].

از آنجا که دانش جنین‌شناسی و تکنولوژی تولید جنین آزمایشگاهی در کشور ما در دهه اخیر توسعه جدی یافته و نیز با توجه به هزینه‌های گزاف تهیه محیط‌های تجاری که نتایج نه چندان مناسبی را در شرایط هم‌کشتی ایجاد می‌کند، مطالعه حاضر برای ارایه یک فرمول مشخص متوالی از SOF بدون نیاز به هم‌کشتی طراحی شد. همچنین در این مطالعه اثر افزودنی‌های مختلف از جمله EDTA، سرم، گلوکز در مراحل مختلف کشت جنین‌های گاو بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی به‌جز موارد ذکر شده از شرکت سیگما

Archive of SID

www.SID.ir

(Sigma Louis , MO, USA) تهیه شد.

استحصال اووسیت‌ها و انجام بلوغ آزمایشگاهی

بلافاصله بعد از کشتار، تخمدان‌های گاو از یک کشتارگاه محلی جمع‌آوری و در محلول نرمال سالین ۰/۹درصد (۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد) که حاوی آنتی بیوتیک (penicillin 100 IU/ml, streptomycin 100 µg/ml) بود به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه توده‌های سلول‌های کومولوس- اووسیت(COCs) از فولیکول‌های شفاف با سایز ۸-۲ mm توسط سرنگ ۱۰ ml با سر سوزن گوژ ۱۸ یک‌بار مصرف حاوی H-TCM+10% FCS + 300 IU/ml Heparin در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گرادآسپیره شدند. سپس COC هایی که حاوی سیتوپلاسم گرانوله یکنواخت احاطه شده با بیش از دو لایه سلول‌های کومولوس بودند، انتخاب و پس از سه بار شستشو در H-TCM+ 10% FCS به محیط بلوغ TCM199 حاوی FCS, HMG(0.1 IU/ml), 17β- Estradiol (1 µg/ml) 10% انتقال داده شدند. برای انجام بلوغ هر ۵ COC درون یک قطره ۱۰۰ µl بلوغ حاوی هم‌کشتی سلول‌های ورو بود قرار گرفتند. بلوغ آزمایشگاهی در شرایط حداکثر رطوبت، دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد انجام گرفت (Labotect C200, Germany) [٤].

آماده سازی اسپرم و انجام لقاح آزمایشگاهی

در سراسر این مطالعه از ویال‌های مایع منی منجمد دو گاو هلشتاین با باروری بالا که به‌صورت تجاری موجود بود استفاده شد. برای انجام IVF پس از دو بار شستشو، COC های بالغ در گروه‌های ۲۵ تا ۳۰ تایی به قطره‌های ۲۰۰ میکرولیتری محیط لقاح پوشیده شده با روغن مینرال منتقل شدند.

محیط لقاح متشکل از NaCl (114MM), NaH_2PO_4 (0.39MM), Na-Lactate (13.3MM), $CaCl_2$ (2MM), $MgCl_2$ (0.5 MM), Na-Pyrovate (0.2 MM), Penicillin (50 IU/ ml), Sterptomycin (50 µg/ml), $NaHCO_3$ (25MM), Heparin (10 µg/ml), Penicillamine (20 µM), Hypotaurine (10Mm), Epinephrine (1 µM) , BSA (6mg/ml) بود.

پس از ذوب مایع منی در آب۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسپرم‌های متحرک با استفاده از روش swim-up جدا سازی شده و در غلظت نهایی ۱×۱۰^{٦}/ml به قطره‌های لقاح افزوده شدند. مجموعه اسپرم و اووسیت‌ها برای مدت ۲۰ ساعت در شرایط ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ماکزیمم انکوبه شدند [۱۲].

طرح آزمایش کشت آزمایشگاهی جنین‌ها

از آنجا که دیدن پیش هسته‌ها (pronucleus) در اووسیت‌های گاو به دلیل گرانولاسیون فوق العاده سیتوپلاسم امکان پذیر نیست، تمام زیگوت‌های احتمالی حاصل از لقاح اووسیت‌های بالغ شده از توده سلول‌های کومولوس متسع خود برهنه شدند و پس از شستشو، اووسیت‌های دژنره شده یا در حال دژنراسیون حذف و سپس سایر زیگوت‌های احتمالی به‌طور تصادفی در ۵ گروه آزمایشی SOF (SOF E، SOF D، SOF C، SOF B و SOF A) مطابق الگوی شماتیک شکل ۱ به شرح زیر کشت داده شدند.

آزمایش ۱؛ اثر افزودن گلوکز در مقطع دوم کشت متوالی (SOF) جنین‌های گاو (SOF A *vs.* SOF B): طی سه تکرار، زیگوت‌های فرضی گاو به‌طور اتفاقی در دو گروه آزمایشی SOF A و SOF B به مدت ۹ روز کشت داده شدند. در مقایسه با گروه SOF A، محیط کشت SOF B حاوی ۱/۵ mM گلوکز طی فازدوم کشت جنینی بود.

آزمایش ۲؛ اثر افزودن FCS در مقطع اولیه کشت متوالی (SOF) جنین‌های گاو (SOF B *vs.* SOF C): در این آزمون،

Archive of SID
www.SID.ir

زیگوت‌های فرضی در دو گروه آزمایشی SOF B و SOF C به مدت ۹ روز کشت داده شدند. در مقایسه با گروه SOF B، جنین‌های گروه SOF C حاوی مقدار ۱۰ درصد سرم طی دوره اول کشت جنین بودند.

آزمایش ۳؛ اثر افزودن EDTA در مقطع اولیه کشت متوالی (SOF) جنین‌های گاو (SOF D *vs.* SOF B): برای بررسی اثر احتمالی EDTA بر تکوین آزمایشگاهی جنین‌های گاو، زیگوت‌های کشت داده شده در گروه SOF D به مدت سه روز در حضور EDTA کشت داده شدند و سپس در شرایط مشابه با گروه SOF B به مدت ۵ روز کشت داده شدند.

آزمایش ۴؛ اثر افزودن همزمان EDTA و سرم در مقطع اولیه کشت متوالی (SOF) جنین‌های گاو (SOF E *vs.* SOF D و SOF E *vs.* SOF B): در این آزمون اثر حضور همزمان EDTA و سرم در مقطع اولیه کشت جنین بر تکوین آزمایشگاهی جنین‌های گاو بررسی شد. همچنین برای تبین بهتر اثر EDTA و FCS، میزان تکوین آزمایشگاهی گروه SOF E که ناشی از حضور توام EDTA و FCS در فاز اول کشت جنین بود با گروه SOF B که فاقد هر دو فاکتور در مرحله اول بود و نیز SOF D که واجد تنها EDTA در فاز اول کشت جنین بود مقایسه شد.

آزمایش ۵؛ مقایسه نحوه تکوین زیگوت‌های فرضی کشت داده شده در محیط‌های کشت متوالی (SOF A *vs.* SOF B *vs.* SOF C *vs.* SOF D *vs.* SOF E): طی این آزمون نتایج کلی تکوین زیگوت‌های حاصل از IVF اووسیت‌های گاو که در انواع مختلف محیط‌های SOF کشت داده شده بود (شکل ۱) با یکدیگر مقایسه شدند.

در تمامی گروه‌های آزمایشی تعداد ۵ جنین در یک قطره ۵۰µl کشت قرار داده شد. تمام زیگوت‌های احتمالی در شرایط ۹۰ درصد رطوبت، دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد، O_2 ۵ درصد کشت داده شدند. در سرتاسر دوره کشت، هر دو روز یکبار جنین‌ها به دیش‌های حاوی محیط کشت جدید مطابق گروه آزمایشی مربوط انتقال داده شدند.

جدول ۱ فرمول کامل محیط پایه SOF طراحی شده در این مطالعه را نشان می‌دهد. محیط پایه SOF مطابق با محیط طراحی شده توسط ترویت (Tervit) و همکاران در سال ۱۹۷۲ [۱۳] تهیه و ترکیبات اضافه شده به محیط پایه براساس تحقیقات گسترده موجود در این زمینه انجام شد [٤، ۸ و۱۹-١٤].

جدول ۱. فرمول کامل محیط پایه متوالی SOF طراحی شده در مطالعه حاضر

نوع ماده	میزان مورد نیاز
NaCL	۶/۲۹ gm
KCL	۰/۵۳۴ gm
KH_2PO4	۰/۱۶۲ gm
Mg SO_4. 7H2O	۰/۱۸۲gm
Na – Lactate (L-7900)	۶۰۰ µl
Analar Water	۹۴/۴ ml
Analar Water	۲۰ ml
Na – Pyrovate	۰/۱۶ gm
Analar Water	۲۰ ml
$CaCl_2$, $2H_2O$	۰/۵۲۴ gm
Analar Water	۷۸/۵ ml
Na – Tri – Citrate	۰/۰۱ gm
Mg – Inositol	۰/۰۵ gm
Na – HCO3	۰/۲۱ gm
Stock A	۱۰ ml
Stock B	۱ ml
Stock C	۱ ml
BME (50X)(EAA)	۳ ml
MEM (100X)(NEAA)	۱ ml
Glutamine (200mm) L-Glx	۱۰۰ µl
BSA (Fraction V)	۱ gm

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی جنین‌ها

تمامی زیگوت‌های احتمالی برای یک دوره ۹- ۸ روزه (روز لقاح = روز صفر) و در شرایط ۳۸/ درجه سانتی‌گراد، CO2 ۵ درصد، O2 ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد کشت داده شدند. پیشرفت جنین‌ها هر ٤٨ ساعت یک‌بار به‌صورت تسهیم یافته (cleaved) و ١٦-٨ سلولی، مرولا، بلاستوسیست اولیه، متسع در حال شکوفایی و شکوفا ثبت شد.

آنالیز آماری

برای مقایسه آماری درصد پیشرفت‌های جنین‌های کشت داده شده در هر گروه آزمایشی، در مواردی که نتایج از منحنی طبیعی نرمال خارج بود با آزمون آماری دانکن (DMRT) به‌وسیله نرم افزار SAS (Ver 16.0) انجام شدند و در مواردی که داده ها نرمال نبودند به کمک تبدیل Yi = sqrt (Xi + 0.5) داده‌ها تبدیل شده و نرمال بودن آن‌ها در سطح ۰/۰۰۱ تأیید شد و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین روی داده‌های تبدیل شده انجام شد.

یافته‌ها

از تعداد ۲۲۰ عدد تخمدان گاو جمع‌آوری شده از کشتارگاه، تعداد ۱۷٦۰ عدد COC نابالغ استحصال شد که تعداد۱۵۵۰ عدد آن‌ها برای انجام بلوغ آزمایشگاهی کشت داده شد. پس از انجام لقاح آزمایشگاهی، تعداد ١٤٤٧ عدد زیگوت فرضی در ۵ گروه آزمایشگاهی مطابق طرح آزمایشی شکل ۱ کشت داده شد.

جدول ۲ نتایج کلی مقایسه آماری تکوین جنین‌های کشت داده شده در هر گروه را در مقاطع مختلف کشت آزمایشگاهی نشان می‌دهد

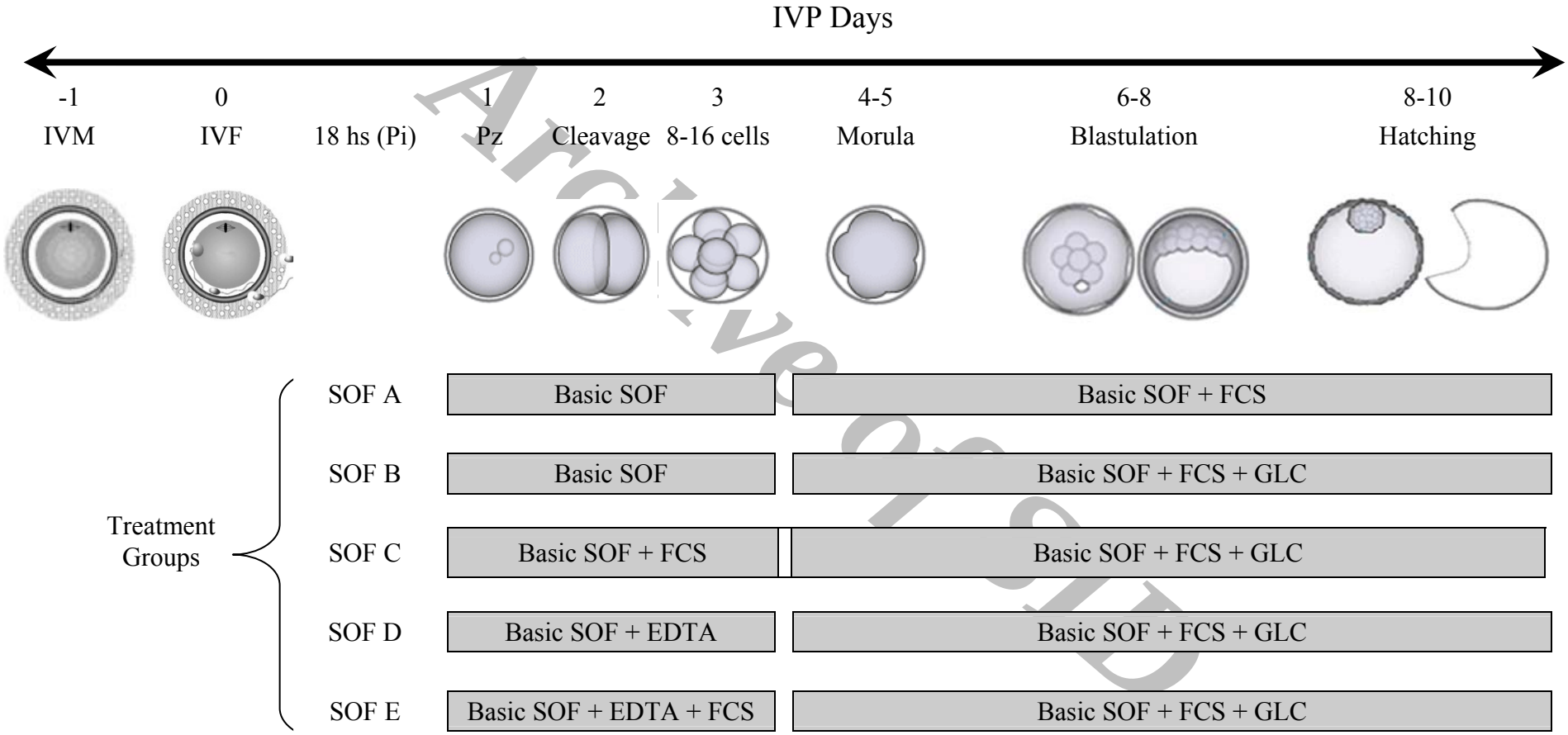
آزمایش ۱؛ اثر حضور گلوکز در فاز دوم کشت متوالی (SOF) بر میزان تکوین آزمایشی جنین (SOF A *vs.* SOF B) :در این آزمایش برای بررسی آثار احتمالی گلوکز بر تکوین جنینی، گلوکز به مقدار ۱/۵ میلی‌مولاربه مقطع دوم کشت جنینی افزوده شد.

جدول ۲. میزان تکوین زیگوت‌های حاصل از IVF اووسیت‌های گاو که در سیستم‌های مختلف SOF کشت داده شدند.

گروه‌های درمانی	تعداد زیگوت‌ها	تعداد (درصد) پیشرفت جنین‌ها در مراحل				
		کلیواژ	مرولا	بلاستوسیست روز ۷	بلاستوسیست روز ۸	شکوفایی
SOF A	۳۳۵	۱۹۷(۵۸/۸)**ab**	٦۵(۳۳/۰)**b**	۳٤(۱۷/۲)**b**	۲۷(۱۳/۷)**b**	۱۱(٤۰/۷)**bc**
SOF B	۲۵۹	۱۷(۵٦/٦)۰**ab**	۳٦(۲۱/۳)**b**	٤۲(۲٤/۷)**b**	۲۹(۱۷/۰)**bd**	۱٤(٤۸/۲)**bc**
SOF C	۱۵٦	۷۲(٤٦/۱)**b**	٤۳(۵۹/۷)**a**	۳۷(۵۱/۳)**a**	۳۱(٤۳/۰)**a**	۲٦(۸۳/۸)**a**
SOF D	۲۹۱	۲۰۳(٦۹/۷)**ab**	۱۱۱(۵٤/٦)**ab**	۱۵(۷/۳)**c**	۱۳(٦/٤)**c**	۵(۳۸/٤)**bc**
SOF E	۱۸٤	۱۰٦(۵٦/۵)**ab**	۵۷(۵۳/۷)**ab**	۷(٦/٦)**c**	۱۱(۱۰/۳)**cd**	۳(۲۷/۲)**cd**

در هر ستون، داده‌های با حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نیستند ($p\leq0.05$)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: طرح شماتیک الگوی کشت آزمایشگاهی زیگوت های گاو: اووسیت های نابالغ پس از انجام بلوغ و لقاح آزمایشگاهی مطابق طرح شماتیک در ۵ گروه کشت داده شدند.

IVM: In Vitro Maturation IVF: In Vitro Fertilization Pz: Presumptive zygotes SOF: Synthetic Oviductal fluid

Archive of SID

www.SID.ir

اگرچه میزان تسهیم اولیه جنینی (کلیواژ) و همچنین میزان پیشرفت جنین‌ها طی مقاطع مختلف تکوین آزمایشگاهی در دو گروه SOF A و SOF B تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱) ولی نکته قابل توجه آن است که حضور گلوکز در فاز دوم کشت جنینی سبب بهبود نسبی میزان تکوین بلاستوسیست روز هفتم و هشتم و میزان شکوفایی جنین‌های گروه SOF B حاوی گلوکز در مقایسه با گروه SOF A شد (به ترتیب ۲٤/۷، ۱۷/۰، ٤۸/۲ درصد در مقابل ۱۷/۲، ۱۳/۷ و ٤۰/۷ درصد).

آزمایش ۲؛ اثر حضور سرم در فاز اول کشت متوالی (SOF) بر میزان تکوین آزمایشگاهی جنین (SOF C *vs.* SOF B): طی این آزمون، سرم به میزان ۱۰درصد به فاز اول کشت متوالی جنین‌های گروه SOF C اضافه و با نتایج تکوین جنینی در گروه فاقد سرم در فاز ۱ (SOF B) مقایسه شد. نتایج حاصل در جدول ۲ به روشنی بیانگر آن است که اگرچه در حضور سرم میزان کلیواژ جنین‌های گروه SOF C (٤٦/۱ درصد) به‌طور غیرمعنی‌داری نسبت به گروه SOF B (٦٥/٦ درصد) کاهش یافته ولی میزان تکوین مرولا، بلاستوسیست روز هفتم و هشتم و نیز شکوفایی جنین‌های حاصل از گروه SOF C به‌طور معنی‌داری بالاتر از مقادیر مربوط به گروه SOF B است (به ترتیب ۵۹/۷، ۵۱/۳، ٤۳/۰، ۸۳/۳ درصد در مقابل ۲۱/۳، ۲٤/۷، ۱۷/۰ و ٤۸/۲ درصد).

آزمایش ۳؛ اثر حضور EDTA در فاز اول کشت متوالی (SOF) بر میزان تکوین آزمایشگاهی جنین (SOF D *vs.* SOF B): برای تبین آثار مفید احتمالی گزارش شده در مورد حضور EDTA در فاز اول کشت متوالی بر میزان تکوین جنین‌های حاصل، زیگوت‌های حاصل از IVF در محیط کشت متوالی پایه (basic SOF) در حضور (SOF D) و عدم حضور (SOF B) EDTA کشت داده شدند. نتایج جدول ۲ نشانگر آن است که میزان تسهیم اولیه جنینی در حضور EDTA (SOF D) (٦۹/۷ درصد) به‌طور نسبی بالاتر از گروه SOF B (٦٥/٦ درصد) و میزان تکوین مرولا در گروه SOF D به‌طور کاملاً معنی دار (٥٤/٦ درصد) بالاتر از گروه SOF B (۲۱/۳٪) است. با این وجود نتایج تکوین بلاستوسیست روز هفتم و هشتم زیگوت‌های کشت داده شده در حضور EDTA (SOF D) (۷/۳ و ٦/٤ درصد) به‌طور کاملاً معنی‌داری پایین‌تر از گروه SOF B (۲٤/۷ و ۱۷/۰ درصد) بود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که اگرچه EDTA طی مراحل اولیه کشت جنینی اثرهای مناسبی را در کشت جنین ایفا می‌کند ولی میزان تولید بلاستوسیست این زیگوت‌ها به‌شدت کاهش می‌یابد.

آزمایش ۴؛ اثر حضور توام EDTA و سرم در فاز اول کشت متوالی (SOF) بر میزان تکوین آزمایشگاهی جنین (SOF E *vs.* SOF D و SOF E *vs.* SOF B): طی این آزمایش برای بیان بهتر اثرهای متناقض EDTA طی فاز اول و دوم کشت (آزمایش ٤) و بر اساس گزارش‌های موجود در مورد آثار سرم، زیگوت‌های گروه SOF E در فاز اول کشت در حضور سرم و EDTA کشت داده شدند و میزان تکوین کلی آن‌ها با دو گروه مقابل SOF D و SOF B مقایسه شد.

الف: **SOF E *vs.* SOF B**: نتایج حاصل در جدول ۲ بیانگر آن است که اگرچه میزان تسهیم اولیه جنینی گروه SOF E (٥٦/٥ درصد) به‌طور نسبی پایین‌تر از گروه SOF B (٦٥/٦ درصد) است ولی میزان تکوین جنین مرولا در گروه SOF E به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه SOF B است (٥۳/۷ در مقابل ۲۱/۳ درصد). با این وجود نکته قابل توجه آن است که مجدداً مشابه آزمون ۳، میزان بلاستوسیست روز هفتم و هشتم زیگوت‌های کشت داده شده در حضور EDTA و سرم

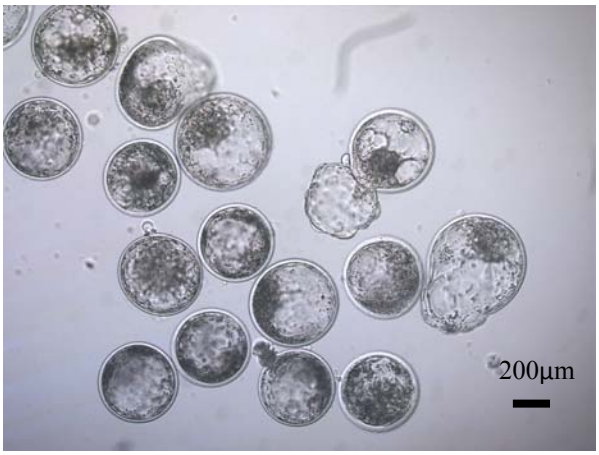
Archive of SID
www.SID.ir

(SOF E) به‌طور کاملاً معنی‌داری پایین‌تر از گروه SOF B است (به‌ترتیب ٦/٦، ۱۰/۳ درصد در مقابل ۲٤/۷ و ۱۷/۰ درصد).

ب: **SOF E *vs.* SOF D**: تنها تفاوت دو گروه SOF E و SOF D حضور سرم در فاز اول کشت در گروه SOF E است و در غیر این‌صورت هر دو گروه، شاهد حضور EDTA در فاز اول کشت زیگوت ها است. نتایج حاصل از تکوین جنین این دو گروه (جدول ۲) نشانگر آن است که صرف نظر از تفاوت‌های غیر معنی‌دار میزان تسهیم و روند پیشرفت این دو گروه بسیار نزدیک به هم است و از الگوی مشابهی تبعیت می نماید. با توجه به نتایج جدول ۲ به‌نظر می‌رسد که حضور سرم در گروه SOF E نتوانسته است آثار منفی EDTA بر تکوین جنینی در مراحل پیشرفته را کاهش دهد.

آزمایش ۵؛ مقایسه تکوین جنین‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی SOF: همان‌گونه که در نتایج جدول ۲ مشاهده می‌شود میزان تسهیم و تولید جنین مرولا درگروه‌های مختلف SOF نزدیک به همدیگر و فاقد اختلاف معنی‌دار بود. با این وجود در میزان تولید بلاستوسیست روز هفتم و هشتم اختلافات معنی‌داری بین گروه‌های مختلف SOF دیده می‌شود به طوری‌که بالاترین میزان تولید بلاستوسیست روز هفتم و هشتم و نیز میزان شکوفایی مربوط به گروه SOF C (به‌ترتیب ۵۱/۳، ٤۳/۰ و ۸۳/۳ درصد) است که به‌طور معنی‌داری بالاتر از همه گروه‌های دیگر SOF است. همچنین میزان تولید بلاستوسیست در زیگوت‌های کشت داده شده در حضور EDTA در کمترین مقدار خود است که به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های آزمایشی SOF A، SOF B و SOF C است.

با توجه به جدول ۲ به‌نظر می‌رسد که گروه SOF C با وجود نرخ نسبتاً پایین تسهیم اولیه، از توان بسیار مناسبی برای تکوین جنین‌های آزمایشگاهی تا مرحله شکوفایی برخوردار باشد. شکل ۲ الگوی تکوین زیگوت‌های گاو کشت داده شده در محیط متوالی SOF را در مراحل مختلف نشان می‌دهد. شکل ۲ جنین‌های گاو این مطالعه که در محیط کشت SOF C کشت داده شده است را نشان می دهد.



شکل ۲: جنین های توسعه یافته گاو که در محیط کشت SOF C مطالعه اخیر کشت داده شده اند (بار: ۲۰۰ میکرومتر).

بحث

تولید آزمایشگاهی جنین (IVP) یکی از تکنولوژی‌های ارزشمند برای افزایش سرعت بهبود صفات ژنتیکی دام و نیز یک ابزار تحقیقاتی مهم در دانش جنین‌شناسی است [۳]. در این راستا آزمایشگاه‌های جنین‌شناسی بسیاری در سرتاسر دنیا در زمینه تولید آزمایشگاهی جنین پستانداران فعالیت می‌کنند. اگرچه بسیاری از این آزمایشگاه‌ها در گذشته نه چندان دور از محیط‌های تجاری همراه با سیستم هم‌کشتی برای تولید جنین استفاده کرده‌اند، اما با توجه به معایب و مشکلات متعدد این سیستم‌های کشت در حال حاضر از سیستم‌های کشت متوالی با فرمول معین استفاده می نمایند. اگرچه اغلب این سیستم‌های کشت بر اساس آنالیز شیمیایی ترکیب طبیعی محیط اویداکت طراحی شده است ولی تفاوت‌هایی بعضاً

Archive of SID

www.SID.ir

فراوان در ترکیب و درصد اجزای مختلف این محیط ها وجود دارد [۳ و ۸]. با توجه به گسترش روزافزون تکنولوژی IVP در کشور و نیاز جدی به طراحی یک فرمول کامل و بهینه محیط کشت برای تولید آزمایشگاهی جنین، مطالعه حاضربه بررسی اثر حضور ترکیبات مختلف مطرح در محیط کشت متوالی SOF بر تکوین جنین‌های گاو پرداخت.

نتایج مطالعه حاضربیانگر آن است که اووسیت‌های گاو که به‌طور آزمایشگاهی بالغ شده و لقاح یافته‌اند نه تنها قادرند در یک محیط متوالی (SOF) به‌طور مناسبی مراحل مختلف تکوین آزمایشگاهی را تا مرحله بلاستوسیست و شکوفایی را طی نمایند بلکه با انجام اصلاحات مناسب برخی از فرمول‌های SOF مورد بررسی در این مطالعه قادرند که توان تکوین آزمایشگاهی زیگوت‌های گاو را به‌طور چشمگیری در حد بالاترین گزارش موجود، افزایش دهند [۱۸]. هر چند مقایسه دقیق کیفیت و کفایت جنین‌های هر گروه نیازمند بررسی‌های بیشتر از جمله رنگ‌آمیزی تفریقی بلاستوسیست‌ها و نیز مقایسه میزان تکوین بعد از انتقال و لانه‌گزینی جنین‌هاست که لازم است در مطالعات بعدی بررسی شود.

از آنجا که در مطالعه اخیر علاوه بر بررسی کفایت محیط متوالی SOF به بررسی اثر اصلاحات مختلف فرمولی این محیط پرداخته شد، نتایج تکوین جنینی حاصل از این اصلاحات به‌عمل آمده از چند نظر قابل بررسی است.

۱- اثر حضور گلوکز در محیط کشت

منبع انرژی مناسب، یکی از مهم‌ترین بخش‌های محیط‌های کشت است. در این میان گلوکز معمول‌ترین و اصلی‌ترین نوع منبع انرژی‌زای مصرفی سلول‌های زنده است [۱۴و ۱۵]. با این وجود شواهد موجود نشانگر آن است که حضور گلوکز طی مراحل اولیه تکوین جنینی قبل از لانه‌گزینی می‌تواند باعث القای آثار نامناسب شود. به‌طور مثال، حضور گلوکز در مرحله قبل از بیان ژنوم جنینی در موش (مرحله دو سلولی) و در گاو (مرحله ۱۶-۸ سلولی تا مرحله مرولا) منجر به ایست تکوینی جنینی به دلایل مختلف از جمله تکوین نامناسب جنینی (مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو ناشی از متابولیت‌های گلیکولیتیک) می‌شود [۱۴]. به همین دلیل اعتقاد کلی بر آن است که لاکتات و پیروات افزودنی‌های انرژی‌زای مهم‌تری طی این مرحله حساس تکوین جنینی تا مرحله بیان ژنومی هستند [۱۷-۱۴]. بنابراین از آنجا که براساس مقالات موجود جذب سلولی گلوکز در جنین‌های آزمایشگاهی و نیز جنین‌های طبیعی (*in vivo*) گاو تنها در مرحله مرولا افزایش می‌یابد [۱۵ و۱۸]، طی این مطالعه نیز گلوکز با غلظت ۱/۵ میلی‌مول تنها از روز ٤ کشت جنینی به بعد اضافه شد. مقایسه نتایج تکوین جنینی دو گروه SOF A و SOF B در جدول ۲ نیز بیانگر آن است که با افزودن گلوکز به دوره دوم کشت متوالی جنینی توان تکوین جنین‌ها تا زمان شکوفایی به‌طور نسبی افزایش یافته که ناشی از آثار مثبت حضورگلوکز است. این امر منجر شد که گلوکز در مرحله دوم سایر گروه‌های آزمایشی متوالی اضافه شود.

۲- اثر افزودن سرم به محیط کشت

یکی از بحث برانگیزترین افزودنی‌های محیط کشت متوالی و نیز تجاری، سرم جنین گاو (FCS) است، به‌طوری‌که در حال حاضر بیش از ۲۰۰ مقاله مختلف به بررسی آثار افزودن سرم به محیط کشت جنین‌های پستانداران پرداخته‌اند [۲۱-۱۸]. برخی از این مطالعات بر این عقیده هستند که سرم می‌تواندطی تکوین آزمایشگاهی رویان گاو، گوسفند و بز اثرهای دو فازی (biphasic) را القا نماید به‌طوری‌که طی مراحل اولیه تکوین جنینی، حضور سرم می‌تواند اثرهای مهاری و طی مراحل نهایی تکوین قبل از لانه‌گزینی اثرهای تحریکی بر رشد جنین القا نماید [۱۷ و۱۹]. با وجود این

Archive of SID
www.SID.ir

موضوع اغلب محققین بر این عقیده هستند که برای کسب بالاترین در صد تکوین آزمایشگاهی جنین نیاز به حضور منابع سرم با منشا جنینی یا بالغ است به‌طوری‌که میزان تکوین آزمایشگاهی جنین در عدم حضور سرم به میزان چشمگیری پایین‌تر از شرایط حضور سرم است [۲۰-۱۸]. مجموع گزارش‌های موجود بر آن عقیده هستند که آثار تحریک‌کنندگی فوق‌العاده سرم مربوط به وجود مواد مختلفی از جمله منابع پروتئینی بالا مانند آلبومین، فاکتورهای رشد، یون‌های گوناگون، مهارکننده‌های مواد سمی و نیز حضور هورمون‌های استروئیدی است[۸ و۱۷]. با این وجود هنوز مکانیسم دقیق عملکرد سرم به‌درستی شناخته نشده است [۸]. مقایسه نتایج تکوین آزمایشگاهی دو گروه SOF C و SOF B در تحقیق حاضر به روشنی بیانگر آن است که با وجود حضور سرم طی فاز دوم کشت آزمایشگاهی جنین‌های هر دو گروه، حضور سرم طی ۷۲ ساعت اول کشت در جنین‌های گروه SOF C منجر شده است که توان تکوین جنین‌های این گروه طی تولید بلاستوسیست روز هفتم (۵۱/۳ درصد)، هشتم (۴۳/۰ درصد) و نیز شکوفایی جنین (۸۳/۸ درصد) به‌طور چشمگیری بالاتر از گروه SOF B (به‌ترتیب ۲۴/۷، ۱۷/۰ و ۴۸/۲ درصد) و نیزگروه‌های آزمایشی از جمله Vero-TCM (به‌ترتیب ۱۵/۶، ۲۰/۶ و ۴۲/۴ درصد) باشد. یک نکته حائز اهمیت در نتایج جدول ۲ آن است که حضور سرم در فاز اول رشد جنین‌های گروه SOF C منجر به یک کاهش اولیه نسبی در میزان تسهیم جنین‌های این گروه (۴۶/۱ درصد) در مقایسه با جنین‌های سایر گروه‌ها شده است. به‌نظر می‌رسد که این کاهش اولیه تسهیم که با یافته‌های سایر محققین [۲۱-۱۸] نیز تطابق دارد، ناشی از آثار مهاری اولیه سرم است. با این وجود اگرچه حضور سرم به‌طور اولیه باعث کاهش میزان تسهیم جنینی شده است ولی میزان تکوین بعدی جنین‌های گروه SOF C به‌طور انفجاری بالاتر از سایر گروه‌ها است، به‌طوری‌که در روز هفتم کشت جنینی در حالی‌که میزان تولید بلاستوسیست گروه‌های آزمایشی SOF A, B, D, E ۶/۶ تا ۲۴/۷ است، میزان تولید بلاستوسیست گروه SOF C، ۵۱/۳ درصد است که نه تنها به‌طور کاملاً معنی‌داری بالاتر از همه گروه‌های آزمایشی است بلکه حتی بالاتر از بسیاری از گزارش‌های موجود در زمینه تکوین آزمایشگاهی جنین است. این مطلب نشانگر کفایت بالای محیط کشت ساختگی مورد استفاده در این مطالعه است که نیازهای کلی و جزئی جنین‌های گاو را تأمین کرده است.

اگرچه سرم جنین گاو جزء اولین افزودنی‌های محیط کشت جنین بوده است ولی به‌طور پیوسته و با افزایش درک و تجربه دانش جنین‌شناسی مسایل و معایب متعددی در زمینه استفاده از سرم در محیط کشت مشخص شده است. از جمله این اشکالات، عدم یکنواختی شرایط کشت به‌دلیل تعویض منبع سرم تهیه شده از جنین‌های کشتارگاهی مختلف، کارخانه‌های مختلف و نیز کشورهای مختلف است. به‌طوری‌که به‌نظر همه محققین با افزودن سرم به محیط کشت، محیط کشت از حالت کاملاً مشخص (Defined) به حالت غیرمشخص (Undefined) درمی‌آید [۱۹ و۲۰]. بنابراین با توجه به احتمال حضور مواد بسیار گوناگون و آثار مختلف آن‌هادر سرم، به‌نظر می‌رسد که امکان بررسی‌های دقیق در زمینه اثر افزودنی خاص بر نحوه تکوین جنین به‌درستی وجود نخواهد داشت. از سوی دیگر احتمال وجود آلودگی‌های پیچیده از جمله آلودگی‌های ویروسی، شانس انتقال آلودگی‌ها به‌دلیل ابتلای جنین‌های آزمایشگاهی ودرنتیجه گوساله‌های متولد شده از آن‌ها را ایجاد خواهد کرد [۲۰]. بنابراین امروزه کوشش بسیاری برای کاهش یا حذف مقادیر سرم محیط کشت و نیز استفاده از مواد جایگزین از جمله آلبومین یا (Synthetic Serum Replacer) SSR شده است [۲۱]. از آنجا که هیچ‌کدام از افزودنی‌های فعلی نتوانسته‌اند به درستی جایگزین مناسب

Archive of SID

www.SID.ir

سرم باشد، انجام مطالعات بیشتر برای ارایه یک ماده مناسب جایگزین سرم ضروری به‌نظر می‌رسد.

۳- اثر EDTA

اولین گزارش‌ها درباره استفاده از EDTA در فرمول کشت آزمایشگاهی مربوط به جنین موش است و دلیل استفاده از این ماده آن است که فعالیت برداشت از محیط (شلاتوری) EDTA می‌تواند باعث خنثی‌سازی و حذف مواد سمی موجود در محیط کشت (از جمله یون‌های سنگین) یا مواد مهاری- سمی حاصل از متابولیسم جنین‌ها (رادیکال‌های آزاد، یون‌های سنگین حاصل از کاتابولیسم و آنابولیسم مواد غذایی) شود. با افزودن این مواد به محیط کشت جنین‌های موش رشد فزاینده‌ای در قابلیت عبور از ایست تکاملی در جنین‌های آزمایشگاهی موش دیده شد [۲۲]. از آن پس اگرچه افزودن EDTA به محیط کشت تجاری به‌صورت معمول انجام می‌شود، ولی گزارش‌های متعدد و اغلب ضد ونقیض در رابطه با افزودن EDTA در محیط کشت جنین‌های گونه‌های مختلف از جمله گاو ارایه شده است. نتایج حاصل در جدول ۲ بیانگر آن است که اگرچه حضور EDTA در فاز اول کشت جنین‌های گاو، چه در حضور سرم (SOF C) و چه در عدم حضور سرم (SOF D) میزان تسهیمات اولیه جنینی (تا مرحله مرولا) را در حد قابل قبولی حمایت کرده است ولی میزان پیشرفت جنین‌ها در مرحله بلاستوسیست و نیز میزان شکوفایی جنین‌ها به‌میزان بسیار چشمگیری پایین‌تر از همه گروه‌های آزمایشی دیگر است. این مطلب نشانگر اثرهای بالقوه مهاری حضور EDTA در فاز اولیه رشد جنینی است که طی مراحل پیشرفته‌تر رشد جنینی و در واقع در مرحله بیان ژنوم جنینی آثار مهاری خود را ابراز کرده است. در تطابق با نتایج اخیر، قابل ذکر است که گروهی از محققین بر این باورند که حضور EDTA در فاز اولیه رشد جنینی نه تنها قادر به تسریع روند تکوین جنینی نیست بلکه حضور آن در فاز دوم رشد جنین‌ها منجر به مهار فعالیت گلیکولیتیک تکوین جنین وکاهش توان تولید انرژی جنینی و درنتیجه دژنراسیون نهایی جنین خواهد شد [۲۲].

در واقع مهمترین دستاورد مطالعه اخیر، ارایه یک فرمول ساده، ارزان و قابل ساخت در هر آزمایشگاه برای توسعه رویان گاو است که می‌تواند با کفایت نهایی بسیار بالاتر از محیط‌های تجاری گران قیمت وارداتی که نیاز به استفاده از سیستم‌های پرهزینه و وقت‌گیر کشت سلولی ورو دارد، عمل کند. نتایج حاصل از مطالعه اخیر به عنوان اولین بررسی در نوع خود بیانگر آن است که مناسب‌ترین فرمول محیط باز، فرمول SOF C است که حاوی غلظت ۱/۵ میلی مول گلوکز طی فاز دوم کشت و حضور کامل ۱۰ درصد سرم در کل دوره کشت است. با این وجود با توجه به تمام مسایل مرتبط با آثار نامساعد احتمالی سرم بر رشد و تکوین جنینی، انجام مطالعات بیشتر برای بررسی امکان حذف سرم و نیز بررسی مجدد امکان افزودن سایر فاکتورها در محیط کشت لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد.

References

1. **Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA** Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol Reprod1982; 27: 147-58.
2. **Moulavi F, Hosseini SM, Ashtiani SK, Shahverdi A, Nasr-Esfahani MH.** Can Vero cell co-culture improve in-vitro maturation of bovine oocytes? Reprod Biomed 2006; 13: 404-11.
3. **Balasubramanian S, Son WJ, Mohana KB, Ock SA, Yoo JG, Im GS, et al.** Expression pattern of oxygen and stress responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. Theriogenology 2007; 68: 265-75.

Archive of SID
www.SID.ir

4. **Gordon I, Ku KH.** Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology 1990; 33: 77-87.
5. **Wetzels AM.** Co-culture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. Hum Reprod 1992; 7: 101-6.
6. **Sakkas D, Jacquenoud N, Leppens G, Campana A**. Comparison of results after in vitro fertilized human embryos is cultured in routine medium and in co-culture on Vero cells: a randomized study. Fertil Steril 1994; 61: 521-5.
7. **Van Blerkom J.** Development of human embryos to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of Vero cells. Hum Reprod 1993; 8: 1525-39.
8. **Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari O.** Changes in requirements and utilization of nutrient during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. Theriogenology 1998; 49: 83-102.
9. **Nedambale TL, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X.** Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. Theriogenology 2004; 62: 437-49.
10. **Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, MCNamara GT, Schoff PK, First NL.** Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. Biol Reprod. 1993; 49:459-62.
11. **Gardner DK.** Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. Fertil Steril 1996; 65:349-53.
12. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Liebfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL** Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology 1086; 25: 591-600.
13. **Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA.** Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J Reprod. Fertil. 1972; 30: 493–7.
14. **Gomez E, Diez C.** Effects of glucose and protein source on bovine embryo development in vitro. Animal Reprod Sci 2000; 58: 23-37.
15. **Donnay I, Feugang JM, Bernard S, Marchandise J, Pampfer S, Moens A, Dessy F.** Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of in vitro produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage. Zygote 2002; 10:189-99.
16. **Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K.** Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. Biol Reprod. 1993; 48(6): 1320-5.
17. **Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR**. Factors influencing in vitro embryo production. Anim Reprod. 2006; 3(1): 19-28.
18. **Holm P, Booth M, Schmidt T, Greve H, Callesen H.** High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 2003; 52(4): 683-700.
19. **Dorland M, Gardner DK, Trounson AO.** Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in bovine embryos. Reprod Fertil Develop 1994; 102: 25-9.
20. **Rebecca LK, Lane M, Bavister BD.** Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. Biol Reprod 1999; 60: 1345-52.
21. **Duque P, Gomez E, Diaz E, Facal N, Hidalgo C.** Use of two replacements of serum during bovine culture in vitro .Theriogenology, 2003; 59: 889-99.
22. **Gardner DK, Lane MW, Lane M**. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. Mol Reprod Dev. 2000; 57(3): 256-61.

Archive of SID

www.SID.ir